

氏 名	はた の しん や 秦 野 慎 矢
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2865 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Pluripotential competence of cells associated with <i>Nanog</i> activity (転写因子に制御される胚性幹細胞の未分化性)

論文調査委員	(主 査) 教 授 山 中 伸 弥	教 授 中 畑 龍 俊	教 授 篠 原 隆 司
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

体細胞が一世代限りの細胞集団で、組織特異的な機能を果たすべく特殊化しているのに対して、生殖細胞や初期胚細胞は、遺伝情報を次世代に伝える細胞で、体を構成する全ての種類の細胞に分化する未分化性を獲得・維持することが重要な働きの1つである。そのため、未分化性維持機構を解明することは、生命の連続性を解きあかすことへと繋がっている。初期胚由来の胚性幹 (ES; Embryonic Stem) 細胞は、際限なく増殖する能力 (無限増殖能) とすべての成体細胞に分化する能力 (多能性) とを兼ね備えていることから、未分化性維持に関わる機構の解明のための有用な材料として用いられている。これまでのマウス ES 細胞の研究からは、未分化性の維持に *Oct3/4*, *Sox2*, *Ezh2*, *Lif*, *Stat3*, *BMP4*, *Wnt* 等の因子からなる分子ネットワークが必要なことまでがわかってきている。

本研究では、2003年に新規に報告された未分化性特異的遺伝子 *Nanog* (我々も独自に同定していた) の特性や機能を解明することを目的に発生生物学や分子生物学的手法を用いて研究を行った。

1. *Nanog* タンパク質の着床前後期胚における発現パターンの解析を、特異抗体を作製して行った。その結果、NANOG 発現は受精卵では検出されず桑実胚から上昇し、細胞核に局在していた。胚盤胞では、内部細胞塊 (ICM) 細胞でのみ発現しており、着床後の E6.5-7.5 日齢胚のエピブラストで発現が見られた。E7.5 日齢胚の STELLA/PGC7 陽性の始原生殖細胞は NANOG 陰性であったのに対して、E12.5 日齢胚由来の生殖細胞は NANOG 陽性であった。
2. NANOG はマウス ES 細胞のみならずヒトやサル ES 細胞でも発現していた。ES 細胞集団中に OCT4 陽性/NANOG 陰性の細胞が約 3 割検出された。また初期胚発生において、OCT4 の発現時期に比較し NANOG の発現時期は限定されていた。NANOG は、より未分化性への特異性の高い分子指標である可能性が示唆された。
3. 体細胞ゲノムの再プログラム化に伴い *Oct-4* が再活性化されることや *Oct-4* の再活性化が体細胞ゲノムの完全な再プログラム化に重要である報告がされている。再プログラム化と *Nanog* の発現を探る目的で、体細胞核移植によるクローン胚や ES 細胞と体細胞の融合細胞を作製した。クローン胚盤胞や ES 融合細胞では、体細胞で抑制されていた *Nanog* が再活性化され、再プログラム化にも必須の役割を果たすことが示唆された。
4. 相同組み換えを応用し *Nanog* ORF 全体を *GFP-Ires-Puro* で置き換えた。*Nanog* (+/-) ES 細胞を樹立したところ、NANOG 発現量が野性型の半分に減少し未分化性が極端に不安定になっていることが明らかになった。
5. 外来性 *Nanog* の強制発現の結果、*Nanog* (+/-) ES 細胞の未分化性が回復した。しかし、外来性 NANOG の強制発現による体細胞の未分化細胞への変換や未分化細胞の顕著な形態的变化は観察されなかった。NANOG は発現量依存的に未分化性維持に関わることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、新規に同定された未分化特異的遺伝子 *Nanog* の特性や機能を個体や細胞で解析したものである。

独自に作製した抗マウス NANOG 抗体を用いて、発現パターンを明らかにしている。初期胚では、未受精卵で抑制されていた発現が桑実胚から検出され、その発現は7.5日齢胚の未分化な細胞で維持されている。一方、細胞では、胚性幹 (ES) 細胞において OCT4 陽性/NANOG 陰性の細胞が約3割存在することを明らかにしている。他の未分化特異的遺伝子 OCT4 に比較して、NANOG はより未分化性への強い特異性を示すことが新たに解明された。また核移植や細胞融合実験から、体細胞の再プログラム化により抑制されていた *Nanog* が再活性化することが示され、再プログラム化過程における *Nanog* の重要な役割を示唆する結果を導き出すことに成功している。*Nanog* の機能解析では、発現量が野生型の半量に減少している *Nanog* (+/-) ES 細胞で未分化性の不安定化を発見している。外来性 *Nanog* の強制発現により未分化性が回復することから、*Nanog* は発現量依存的に未分化性維持に関わることを初めて明らかにしている。

以上の研究は、マウスのみならずヒトにおいても幹細胞の未分化性維持に鍵となる役割を果たす分子として認識の高まっている *Nanog* の機能の解明に貢献し、未分化性維持機構の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成17年2月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。